



Universidad
de Navarra

Estudio de la expresión de PYY en el colon de ratones macho NOD y NOD/Scid de 32 semanas

Trabajo Fin de Grado

Grado en Bioquímica

Curso 2020-2021

Autor: **Carmen González Díaz-Cano**

Tutor: Dra. María Elena Bodegas Frías

Índice

<u>Abreviaturas</u>	2
<u>Resumen</u>	3
<u>1. Introducción</u>	4
1.1. <u>Diabetes mellitus</u>	4
1.2. <u>Modelos animales</u>	6
1.3. <u>Trastornos gastrointestinales en diabetes</u>	7
1.4. <u>El sistema neuroendocrino del tracto gastrointestinal</u>	8
1.4.1. <u>Sistema nervioso entérico (SNE)</u>	8
1.4.2. <u>Células endocrinas</u>	9
1.5. <u>Células L: GLP-1 y PYY</u>	10
1.5.1. <u>Poblaciones de células L</u>	10
1.5.2. <u>GLP-1 y PYY</u>	11
1.5.3. <u>El freno ileal</u>	12
<u>2. Antecedentes, hipótesis y objetivos</u>	12
2.1. <u>Antecedentes</u>	12
2.1.1. <u>Estudios sobre la expresión de GLP-1 en intestino grueso</u>	12
2.1.2. <u>Estudios sobre la expresión de PYY en intestino grueso</u>	14
2.2. <u>Hipótesis</u>	14
2.3. <u>Objetivos</u>	15
<u>3. Material y métodos</u>	15
3.1. <u>Material</u>	15
3.2. <u>Métodos</u>	16
3.2.1. <u>Inmunocitoquímica</u>	16
3.2.2. <u>Expresión y recuento de células IR para PYY</u>	18
3.2.3. <u>Análisis de imagen</u>	18
3.2.4. <u>Análisis estadístico</u>	19
<u>4. Resultados</u>	21
4.1. <u>Expresión de PYY en colon de ratones NOD y NOD/Scid</u>	21
4.2. <u>Comparación entre ratones NOD y NOD/Scid de 32 semanas</u>	24
4.3. <u>Comparación entre ratones NOD de 20 y 32 semanas</u>	25
4.4. <u>Comparación entre ratones NOD normoglucémicos e hiperglucémicos</u>	26
4.5. <u>Comparación entre células IR para PYY y GLP-1 en NOD de 32 semanas</u>	27
<u>5. Discusión</u>	28
<u>6. Conclusiones</u>	30
<u>7. Agradecimientos</u>	30
<u>8. Bibliografía</u>	31
<u>9. Anexos</u>	34
9.1. <u>Reactivos de la inmunocitoquímica</u>	34
9.2. <u>Protocolo de la técnica inmunocitoquímica</u>	34

Abreviaturas

ABC	Complejo avidina-biotina
CCK	Colecistoquinina
DAB	Diaminobencidina
DM	Diabetes mellitus
GIP	Polipéptido inhibidor gástrico
GLP-1	Glucagon-like peptide 1 (“péptido similar al glucagón 1”)
HRP	Horseradish peroxidase (“peroxidasa de rábano”)
IC	Intervalo de confianza
ICQ	Inmunocitoquímica
IR	Inmunorreactiva
LSAB	Complejos estreptavidina-peroxidasa-biotina
NOD	Non-obese diabetic (“ratón diabético no obeso”)
NPYR	Receptor del neuropéptido Y
OXM	Oxintomodulina
PPY	Polipéptido pancreático
PYY	Péptido YY o Péptido tirosina tirosina
RIA	Radioinmunoensayo
SNC	Sistema nervioso central
SNE	Sistema nervioso entérico

Resumen

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica que se caracteriza por presentar elevadas concentraciones de glucosa en sangre. Esta situación se origina cuando el páncreas no sintetiza la cantidad de insulina que el organismo necesita, la y/o no es capaz de ser utilizada con eficacia.

La mitad de los pacientes con esta enfermedad presentan múltiples síntomas gastrointestinales como reflujo gastroesofágico, distensión abdominal, náuseas, estreñimiento, diarrea e incontinencia fecal. Algunas de las hormonas que regulan la motilidad gastrointestinal y cuyos niveles se pueden ver alterados en esta patología son: grelina, motilina, CCK, GIP, GLP-1 y PYY.

En este estudio se ha analizado la expresión de PYY en el colon de ratones macho NOD (modelo animal de DM1) y NOD/Scid (grupo control) de 32 semanas de edad, mediante la utilización de técnicas inmunocitoquímicas (ICQ). Los resultados obtenidos no muestran diferencias significativas en el número de células inmunorreactivas (IR) para PYY entre ambas estirpes. Se ha hallado un descenso no significativo al comparar el número de células IR para PYY en ratones NOD de 32 semanas con respecto a los de 20 semanas. Además, también existe un descenso no significativo en el número de células IR para PYY en el colon de los ratones NOD hiperglucémicos con respecto a los normoglucémicos de 32 semanas. Finalmente, se ha comparado la expresión del PYY de los ratones NOD con la expresión de GLP-1 en ratones de la misma edad y condición, ya que ambas son hormonas mediadoras del freno ileal, aunque tampoco se apreciaron diferencias significativas.

1. Introducción

1.1 Diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) es el grupo de enfermedades metabólicas más común de las endocrinopatías existentes. Se caracteriza por un estado de hiperglucemia debido a alteraciones en la secreción de insulina, en su funcionalidad o en ambas. Según datos de la Organización Mundial de la Salud, el número de personas diabéticas ha aumentado drásticamente en todo el mundo, de 108 millones en 1980 a 442 en los últimos años [1].

Las dos principales afecciones de la diabetes son la diabetes mellitus tipo 1 (DM1) y la diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Los diversos tipos de diabetes cursan con diferentes procesos patológicos, como son la destrucción de los islotes de Langerhans en la DM1 o la resistencia a la insulina en DM2. Los síntomas característicos de la enfermedad son [2]:

- **Poliuria:** aumento de la micción, pudiendo llegar a superar los 3 litros diarios, debido a la saturación en la reabsorción de glucosa por parte del tubo contorneado proximal de la nefrona. Esto provoca que, por medio de un proceso osmóticamente activo, se elimine la glucosa por la orina (glucosuria).
- **Polidipsia:** aumento de la sensación de sed debida a la deshidratación ocasionada por la poliuria.
- **Pérdida de peso:** se debe a la disfunción en el metabolismo celular y, en consecuencia, a un descenso en la nutrición.
- **Polifagia:** aumento de la ingesta debido a la sensación de hambre desproporcionada producida por la incapacidad de las células para incorporar la glucosa a su interior y metabolizarla.
- **Astenia:** fatiga y cansancio, relacionada con todos los síntomas anteriormente descritos.

En algunos casos los pacientes desarrollan retinopatía diabética, con gravedad variable, desde visión borrosa hasta ceguera. Se produce por la afección de los pequeños vasos sanguíneos de la retina y suele afectar a ambos globos oculares [3].

Además de todas estas manifestaciones clínicas, en los casos más graves se puede dar cetoacidosis diabética o el síndrome hiperosmolar no cetósico (SHHNC). La

cetoacidosis diabética es bastante común en personas con DM1, caracterizada por hiperglucemia (glucemia>200), deshidratación y acidosis metabólica (pH sanguíneo<7,25), como consecuencia de la presencia masiva de cuerpos cetónicos en sangre. El SHHNC es una condición rara que se da en la población pediátrica y que cursa con una glucemia superior a 600mg/dl, osmolaridad por encima de 330mOsm/L y sin cetonuria ni acidosis [4].

La DM se clasifica en cuatro tipos diferentes atendiendo a las posibles causas que originan la enfermedad [5]:

- a) **Diabetes mellitus tipo 1:** Es una enfermedad que se da con mayor frecuencia en infantes y adolescentes, aunque es posible que se manifieste más tardíamente. Existe una reacción autoinmune que provoca que las células inmunitarias del propio paciente ataquen a las células beta pancreáticas productoras de insulina, lo que da lugar al déficit de esta molécula. Las personas que la padecen necesitan inyecciones diarias de insulina para poder controlar sus niveles de glucosa en sangre.
- b) **Diabetes mellitus tipo 2:** Es la forma más común de la diabetes ya que engloba un 85-90% de los casos totales. Suele darse en adultos, generalmente con obesidad y/o hipertensión, pero cada vez se da más en niños y adolescentes. En esta patología el organismo puede producir insulina, pero lo hace de manera insuficiente y/o no es capaz de responder a sus efectos, es decir, se genera resistencia a la insulina. Esto se traduce en una acumulación de la glucosa en la sangre.
- c) **Diabetes gestacional:** Durante el embarazo ocurren cambios hormonales que pueden dar lugar a un bloqueo de la función de la insulina, como sucede en la DM2. Este suceso suele presentarse en una etapa avanzada de la gestación y afecta al 5% de las mujeres embarazadas. Aunque normalmente desaparece tras el parto, es un factor de riesgo para desarrollar DM2 en el futuro, tanto para las madres como para sus hijos.
- d) **Otros tipos de diabetes:** En los últimos años, la Fundación para la Diabetes está prestando especial atención a los enfermos de diabetes LADA (diabetes autoinmune latente en adultos). Pacientes adultos con DM2, pero que presenta los anticuerpos positivos característicos de DM1. También existen otros tipos de

diabetes como la diabetes de la edad madura que se presenta en el joven (MODY) [6].

Esta clasificación se dio a conocer por primera vez en 1997 por la American Diabetes Association (ADA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) y, desde entonces hasta la actualidad, existen más de 385.800 resultados publicados en PubMed relacionados con “Diabetes mellitus”. Tan solo en el año 2020 se publicaron 25.632 artículos, cifra que pone de manifiesto la relevancia clínica y el impacto que tienen en la investigación a nivel mundial este conjunto de enfermedades.

1.2 Modelos animales de DM

Para el estudio de la DM es necesario recurrir al uso de animales de experimentación, ya que existen varios inconvenientes a la hora de estudiar la patogénesis de esta enfermedad en humanos: 1) el páncreas es un órgano anatómicamente inaccesible, 2) su manipulación puede comprometer la integridad del organismo, 3) muchas veces los pacientes son asintomáticos durante meses o años antes de que la enfermedad sea clínicamente evidente, 4) los daños locales pancreáticos no se manifiestan sistémicamente y, por todos estos motivos, 5) es difícil identificar a los individuos que desarrollarán DM en la población [7].

Para contrarrestar todas estas dificultades, se han utilizado modelos experimentales, sobre todo de rata (Bio-Breeding y Long-Evans Tokushima) y ratón (Non-Obese Diabetic mice). Los ratones NOD son la especie más utilizada para el estudio de la DM1, ya que desarrollan la enfermedad de manera espontánea y siguiendo un proceso patológico similar al de los humanos.

Los ratones NOD presentan una incidencia de la enfermedad del 60-80% en hembras y 20-30% en machos. En estos animales la insulitis comienza a las 3-5 semanas de edad producida por una infiltración masiva en los islotes de Langerhans por parte de las células T CD8+ y CD4+. La hiperglucemia se empieza a manifestar en torno a la semana 12, alcanzando un pico entre las semanas 16-18 [8].

1.3 Trastornos gastrointestinales en diabetes

El tracto gastrointestinal se extiende desde la boca hasta el ano y realiza funciones vitales, incluida la ingestión, descomposición y digestión de nutrientes, absorción de nutrientes y la preparación y expulsión del producto de desecho. Los síntomas gastrointestinales que ocurren comúnmente en personas con diabetes son: reflujo gastroesofágico, distensión abdominal, náuseas, estreñimiento, diarrea e incontinencia fecal. Se ha sugerido que más del 50% de pacientes diabéticos experimentarán en algún momento un síntoma gastrointestinal [9].

- a) **Esófago:** La hiperglucemia aguda inhibe la motilidad esofágica y reduce la presión basal del esfínter esofágico inferior. Se observó hipertrofia muscular esofágica difusa en dos tercios de las personas con diabetes.
- b) **Estómago - Gastroparesia diabética:** La gastroparesia o retraso del vaciamiento gástrico, es un trastorno que retrasa o detiene el movimiento de los alimentos que van desde el estómago hacia el intestino delgado. Se da tanto en pacientes con DM1 como DM2 y algunos de sus síntomas son pérdida de peso, náuseas, vómitos y plenitud gástrica.
- c) **Intestino delgado - Enteropatía diabética:** La hiperglucemia aguda también tiene un efecto importante sobre la motilidad postprandial del intestino delgado, ya que reduce la amplitud de las ondas de presión duodenal y yeyunal, así como retarda el tránsito duodenal-cecal.
- d) **Intestino grueso – Estreñimiento y Diarrea crónica:** Los síntomas gastrointestinales inferiores más comunes son estreñimiento, diarrea, dolor abdominal y distensión. Los estudios de cohortes han informado la presencia de estreñimiento crónico en hasta el 25% de las personas con DM1 y DM2, mientras que la de diarrea crónica es de hasta el 5%.
- e) **Recto y ano – Incontinencia fecal:** La incontinencia fecal ocurre con mayor frecuencia en personas con diabetes y se asocia con la duración de la enfermedad y la presencia de complicaciones microvasculares, incluida la neuropatía autónoma.

1.4 El sistema neuroendocrino del tracto gastrointestinal

El sistema neuroendocrino del tracto gastrointestinal está compuesto por neuronas y fibras nerviosas y por células endocrinas aisladas, presentes en la pared del tubo digestivo y en el epitelio de revestimiento del tracto gastrointestinal. Este sistema se encarga de regular el sistema digestivo controlando la motilidad gastrointestinal, la secreción exocrina y endocrina (hormonas gastrointestinales), la regulación de la ingesta, etc. [10].

1.4.1 Sistema nervioso entérico (SNE)

Es un sistema local con capacidad de operación autónoma, ya que se trata de una subdivisión del sistema nervioso autónomo. Localizado en la pared del esófago, estómago, intestino delgado y grueso, recibe información motora de los sistemas simpático y parasimpático, enviando de vuelta información sensitiva. Las neuronas del SNE se recogen en dos plexos: plexo submucoso y plexo mientérico (Figura 1).

Plexo submucoso o de Meissner:

Localizado en la túnica submucosa regula la secreción endocrina y exocrina, además de controlar la motilidad de la muscular de la túnica mucosa.

Plexo mientérico o de Auerbach:

Se encarga de los movimientos gastrointestinales. Se encuentra principalmente en la túnica muscular entre la capa muscular interna (circular) y externa (longitudinal). Actúa como centro integrador de señales y puede llevar a cabo actos reflejos en ausencia de señal del sistema nervioso central (SNC).

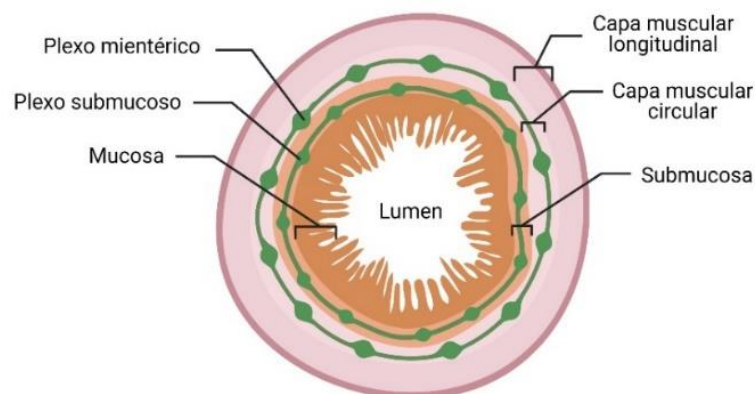


Figura 1. Representación esquemática de un corte transversal del intestino. Las neuronas entéricas están agrupadas en ganglios y nervios (en color verde), organizados en los plexos submucoso y mientérico.

1.4.2 Células endocrinas

En el tracto gastrointestinal existen células endocrinas aisladas en el epitelio de revestimiento, que secretan distintas hormonas las cuales regulan diferentes funciones digestivas como motilidad, control del apetito y metabolismo energético corporal.

A continuación, se explicarán las células endocrinas encargadas de la secreción de hormonas que controlan motilidad interdigestiva y posprandial [11] (Tabla 1).

Motilidad interdigestiva

- a) **Células X/A:** Se localizan en el estómago, duodeno y yeyuno. Secretan grelina, que, además de estimular la motilidad gástrica, regula la secreción de ácido gástrico y estimula el apetito.
- b) **Células M:** Se localizan en duodeno y yeyuno. Liberan la motilina durante el periodo interdigestivo, promoviendo la contracción gástrica.

Motilidad posprandial

- c) **Células I:** Están localizadas en las mucosas de duodeno y yeyuno. Liberan colecistoquinina (CCK), que retrasa el vaciamiento gástrico y desencadena el vaciado de la vesícula biliar.
- d) **Células K:** Están localizadas en el epitelio de revestimiento de duodeno y yeyuno. Secretan polipéptido inhibidor gástrico (GIP), que estimula la secreción de insulina y retrasa el movimiento del intestino delgado.
- e) **Células L:** Se encuentran predominantemente en íleon y colon. Producen y segregan varios polipéptidos, como oxintomodulina (OXM), péptido similar al glucagón (GLP-1) y/o péptido tirosina tirosina (PYY). Las células L participan en diferentes funciones, tales como: la estimulación de la secreción de insulina en las células beta pancreáticas, la motilidad, la secreción gastrointestinal, la defensa inmune local, la proliferación celular, el apetito y en la modulación del freno ileal.

Célula	Localización	Molécula	Función
X/A	Estómago, duodeno y yeyuno	Grelina	Estimula motilidad gástrica y apetito, regula la secreción de ácido gástrico.
M	Duodeno y yeyuno	Motilina	Promueve la contracción gástrica.
I	Duodeno y yeyuno	CCK	Retrasa el vaciamiento gástrico; Estimula la liberación de enzimas biliares y pancreáticas.
K	Duodeno y yeyuno	GIP	Estimula la producción de insulina y retrasa el movimiento intestinal.
L	íleon y colon	GLP-1	Estimula la producción de insulina, inhibe el vaciado gástrico y motilidad intestinal; Mediador del freno ileal.
L	íleon y colon	PYY	Retrasa el vaciado gástrico, inhibe la secreción gástrica y pancreática; Mediador del freno ileal.

Tabla 1. Las células endocrinas, dónde se localizan, las moléculas gastrointestinales que secretan y las funciones que desempeñan.

1.5 Células L: GLP-1 y PYY

1.5.1 Poblaciones de células L

Existen tres poblaciones distintas de células L: las células que producen exclusivamente GLP-1, las que producen PYY y las células GLP-1/PYY, capaces de secretar ambas moléculas [12] (Figura 2).

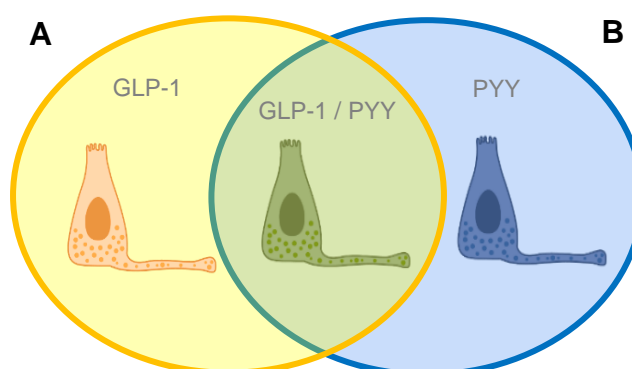


Figura 2. Diagrama representativo de las tres poblaciones de células L. (A) En amarillo las células L que secretan GLP-1, (B) en azul las células que secretan PYY y en verde las células coexpresoras de GLP-1 y PYY.

1.5.2 GLP-1 y PYY

El GLP-1

El GLP-1 es una hormona peptídica de unos 30 aminoácidos, derivada del gen del glucagón. Su función fisiológica principal es la estimulación de la producción de insulina y regulación de los niveles de glucosa en sangre. Esta función la lleva a cabo mediante su unión a los GLP-1R, que son receptores acoplados a proteínas G presentes en las células beta pancreáticas. Esta interacción provoca un aumento en los niveles de AMPc y calcio intracelulares, seguido de la liberación de insulina [13].

El GLP-1 desempeña otras funciones a nivel digestivo, como la inhibición de la secreción de glucagón, del vaciado gástrico y de la ingesta de alimentos (actuando sobre el centro de saciedad del SNC). También actúa en la zona posterior del tubo digestivo modulando la actividad del freno ileal [14].

El PYY

El péptido tirosina tirosina o PYY es una molécula de hasta 36 aminoácidos con dos residuos de tirosina (Y), uno en su extremo N-terminal y el otro en el C-terminal, de ahí su nombre (Figura 3). Tiene dos formas distintas, la forma predominante, PYY₃₋₃₆, y la PYY₁₋₃₆ [15].

Su función molecular reside en su unión a receptores NPYR, receptores acoplados a proteína G de clase A, involucrados en el control de procesos como el apetito, el ritmo circadiano y la ansiedad. Se han descrito hasta cinco tipos de estos receptores en mamíferos, aunque solo cuatro de ellos están presentes en humanos. Actualmente son considerados como potenciales dianas terapéuticas para la obesidad y otros trastornos, ya que cada receptor está codificado por un gen distinto.

Además, este péptido participa en una amplia variedad de funciones digestivas, incluida la regulación de la producción y secreción de insulina, la homeostasis de la glucosa y como mediador del freno ileal [16].

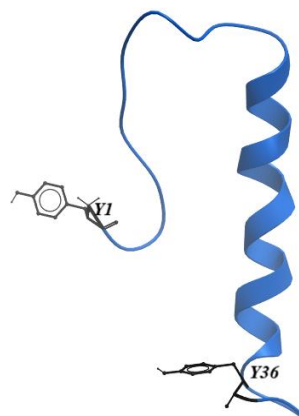


Figura 3. Modelo 3D del PYY con los residuos Y1 e Y36 (en color negro).

1.5.3 Freno ileal

El freno ileal o mecanismo de retroalimentación del íleo distal, es un mecanismo primario de retroalimentación negativa que controla la velocidad a la que el alimento se mueve a través del intestino. Su función es asegurar que la tasa de tránsito de los alimentos en el intestino sea óptima para la digestión y la absorción de los nutrientes. De este modo, si llegara alimento no digerido al íleon o este se viera expuesto a lípidos, el freno ileal se activaría y disminuiría la motilidad yeyuna, impidiendo el paso del quilo al colon [17]. La activación del freno ileal resulta en la disminución de la ingesta de alimentos y la sensación de saciedad [18].

Estos mediadores hormonales pueden verse alterados en enfermedades como la DM, de hecho, hay estudios en los que se muestran niveles elevados de GLP-1 en pacientes con DM2 [19], disminuidos [20] o similares [21] a los de la población sana. Por su parte, el PYY se ha visto disminuido en pacientes con DM2 [15][22].

Por lo tanto, esta desregulación de los niveles hormonales de GLP-1 y PYY que se da en la DM podría estar relacionada con la disfunción del freno ileal, que, como consecuencia, ocasiona diarreas, estreñimiento e incontinencia fecal a los pacientes.

2. Antecedentes, hipótesis y objetivos

2.1 Antecedentes

2.1.1 Estudios sobre la expresión de GLP-1 en intestino grueso

Los datos que se tienen hasta el momento sobre el GLP-1 en pacientes con DM1 son controvertidos. Vilsboll y colaboradores demostraron que la secreción de GLP-1 es normal en pacientes con DM1 [23], mientras que Lugari y colaboradores evidenciaron su disminución con respecto a individuos sanos [24].

Los datos sobre la concentración de GLP-1 en modelos animales de DM1 son igual de controvertidos que los obtenidos en pacientes. En 2004, Valverde y colaboradores estudiaron la expresión GLP-1 en intestino de ratas BB-diabetes prone (BBdp) y ratas control (BBc) mediante radioinmunoensayo (RIA). Encontraron una concentración de GLP-1 más baja en las ratas predispuestas a diabetes [25]. Por otro lado,

Berghöfer y colaboradores demostraron, también mediante RIA, que la expresión de GLP-1 en el intestino estaba inalterada en las ratas BBdp [26].

La Dra. Alcaraz Ortega, en su Tesis Doctoral, realizada en el Departamento de Histología y Anatomía Patológica de la Universidad de Navarra (2012) [27], estudio la expresión de GLP-1 en el colon de ratones macho NOD y NOD/Scid de 5, 20 y 32 semanas de edad mediante la utilización de técnicas inmunocitoquímicas. Concluyó que:

- 1) Existen diferencias significativas en la densidad de células IR para GLP-1 en el colon de ratones NOD de 20 con respecto a los ratones NOD de 32 semanas (Figura 4, A1).
- 2) No existen diferencias significativas en la densidad de células IR para GLP-1 entre el grupo NOD y el control (NOD/Scid) en las semanas 5, 20 y 32 (Figura 4, A2).

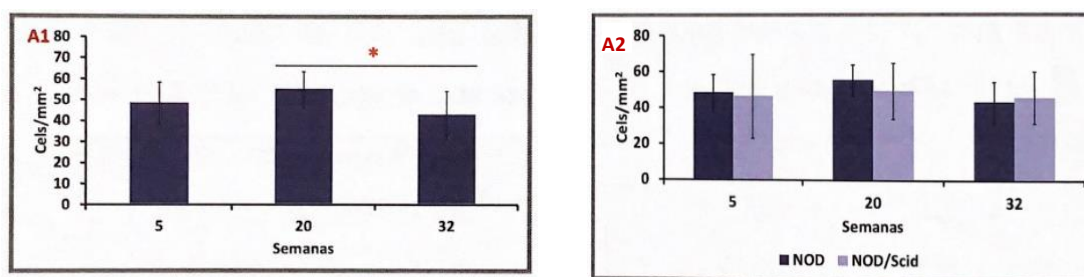


Figura 4. Representación gráfica de los valores medios de la densidad de células IR para GLP-1 en el colon de los ratones NOD (A1), y la comparación con el grupo control (A2). Los gráficos pertenecen a la Figura 94 de la página 153 de la Tesis Doctoral de la Dra. Alcaraz.

La Dra. Alcaraz separó a los ratones NOD de 20 semanas en función de si eran normoglucémicos, hiperglucémicos o diabéticos, observando un aumento no significativo en la densidad de células IR para GLP-1 entre los tres grupos de ratones (Figura 5).

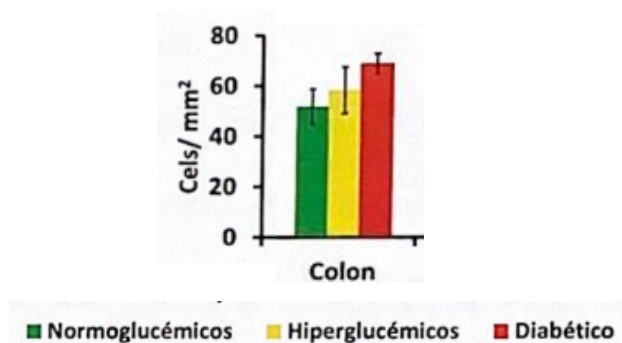


Figura 5. Representación gráfica de los valores medios de la densidad de células IR para GLP-1 en el tracto digestivo de los ratones NOD y los valores según sus glucemias. Los gráficos pertenecen a la Figura 108 de la página 171 de la Tesis Doctoral de la Dra. Alcaraz.

2.1.2 Estudios sobre la expresión de PYY en intestino grueso

Las células PYY se han investigado en el recto de pacientes DM1 de larga duración (13-48 años). Estos pacientes tenían complicaciones orgánicas y síntomas gastrointestinales, como náuseas, vómitos y diarrea, además, presentaban un vaciamiento gástrico lento. Se ha encontrado que el número de células IR para PYY rectales en estos pacientes es significativamente mayor que el de voluntarios sanos [28].

Respecto a los modelos animales de DM1, en el estudio de Spångéus, el número de células IR para PYY en el colon de ratones NOD se redujo significativamente en el grupo de animales diabéticos con respecto a los prediabéticos, posiblemente como causa secundaria a la enfermedad [33]. Sin embargo, el estudio mediante radioinmunoensayo (RIA) de extractos de tejido realizado por El-Salhy M. mostró bajas concentraciones de PYY en el colon tanto en ratones prediabéticos como diabéticos [29].

Don Javier Rosendo Matachana, en su Trabajo Fin de Grado, realizado en el Departamento de Histología y Anatomía Patológica (2015), analizó la expresión de PYY en colon de ratones NOD machos y hembras de 20 semanas de edad y comparó sus resultados con los obtenidos sobre el GLP-1 del doctorado de la Dra. Alcaraz. Concluyó que la diferencia entre machos y hembras respecto a la densidad de células IR para PYY no era significativa a pesar de que los estudios realizados con GLP-1 en la tesis doctoral de la Dra. Raquel Alcaraz dieran altamente significativos e hicieran sospechar que con PYY ocurriría lo mismo al co-localizar en las células L [30].

2.2 Hipótesis

En el presente trabajo, se ha estudiado la expresión de PYY en el colon de ratones macho NOD y NOD/Scid de 32 semanas. Tras, analizar los antecedentes anteriormente descritos y teniendo en cuenta que el PYY puede co-localizar con el GLP-1 y tiene el mismo efecto sobre el freno ileal, se espera que:

- 1) No existan diferencias significativas en la densidad de células IR para PYY en colon de ratones NOD macho y la estirpe control NOD/Scid.
- 2) Existan diferencias significativas en la densidad de células IR para PYY en colon de ratones NOD macho de 20 con respecto a los de 32 semanas de edad.

- 3) Exista un aumento en la densidad de células IR para PYY en colon de ratones NOD macho hiperglucémicos con respecto a los normoglucémicos.
- 4) No existan diferencias significativas en la expresión de PYY y GLP-1 en ratones NOD macho de 32 semanas.

2.3 Objetivos

Para poner a prueba las hipótesis presentada en este trabajo, se propusieron los siguientes objetivos:

- 1) Estudiar la expresión de PYY en el colon de ratones macho NOD y NOD/Scid de 32 semanas de edad.
- 2) Comparar la densidad de células IR para PYY en el colon de ratones macho NOD y NOD/Scid de 32 semanas.
- 3) Comparar la densidad de células IR para PYY en ratones NOD macho de 20 y 32 semanas.
- 4) Comparar la densidad de células IR para PYY en ratones NOD macho normoglucémicos e hiperglucémicos de 32 semanas.
- 5) Comparar la densidad de células IR para PYY y GLP-1 en ratones NOD macho de 32 semanas.

3. Material y métodos

3.1 Material

En el presente Trabajo Fin de Grado se emplearon dos grupos de ratones, un grupo de ratones NOD y otro grupo de ratones control NOD/Scid, ambos de 32 semanas de edad. Los animales pertenecían a la Tesis Doctoral de la Dra. Alcaraz Ortega, del Departamento de Histología y Anatomía Patológica de la Universidad de Navarra (2012). Ella se encargó del mantenimiento de los animales, mediciones de glucemia y sacrificio de los mismos para la obtención y fijación de las muestras del colon.

Como ya se ha mencionado en el apartado *1.2 Modelos animales*, los ratones tipo NOD son la especie murina más utilizada para el estudio de la DM1. Esto se debe a que desarrollan la enfermedad de manera espontánea y de forma similar a los humanos, entre la tercera y quinta semana postnatal, alcanzando la diabetes franca alrededor de la décimo

segunda semana. Se emplearon un total de veinte ratones, diez de cada grupo, y de cada uno de los animales se obtuvieron veinte cortes seriados* del colon, de los cuales fueron seleccionados los cortes número 4, 11 y 17 (Figura 6).

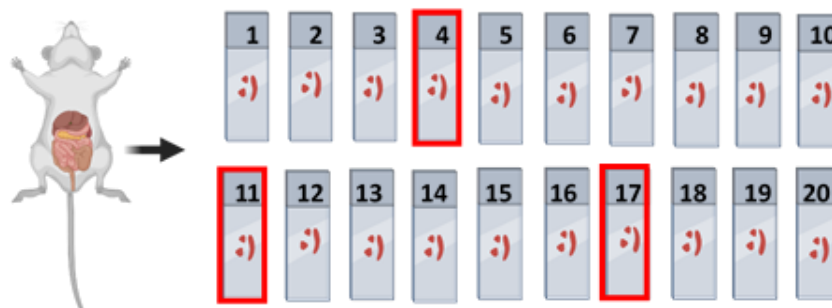


Figura 6. Representación gráfica de los veinte cortes seriados, obtenidos del colon de cada uno de los veinte ratones. Los recuadros rojos indican los cortes seleccionados para este trabajo.

* La inclusión y el corte de las muestras de colon se llevó a cabo por el personal técnico de laboratorio (D. Javier García).

3.2 Métodos

3.2.1 Inmunocitoquímica

La técnica que se ha empleado, en los 60 cortes seleccionados, es la inmunocitoquímica indirecta mediante el uso del complejo EnVision™ Dako sobre los cortes histológicos desparafinados. Este método nos permite detectar *in situ* y de manera específica una proteína de interés.

Anticuerpo primario

El anticuerpo primario empleado es un anticuerpo policlonal de conejo frente a PYY (Enzo life Sciences/PA1254), a dilución 1:500. Este anticuerpo se obtiene a partir de un proceso de inmunización del animal tras ser expuesto a PYY de cerdo [31].

Al tratarse de un anticuerpo policlonal, hay que tener en cuenta que se compone de una mezcla de diferentes inmunoglobulinas frente a diversos epítopos de un mismo antígeno (en este caso PYY). La naturaleza policlonal de este anticuerpo hace que el espectro de reactividad frente a PYY aumente considerablemente. Además, supone una producción más sencilla, rápida y barata respecto a los anticuerpos monoclonales. Sin

embargo, estas mismas características ocasionan una serie de inconvenientes, tales como la dificultad para reproducir el proceso de inmunización, por lo que cada antisuero será único y limitado [32].

Anticuerpo secundario y revelado

Se empleó la técnica de amplificación polimérica mediante el uso del polímero HRP anti-conejo, el cual presenta múltiples moléculas de peroxidasa unidas a su estructura y está conjugado con anticuerpos secundarios (Figura 7). De esta forma, conseguimos reducir el marcaje inespecífico que se da en las técnicas de amplificación que emplean biotina. Además, se aumenta la sensibilidad y se reduce el número de pasos de la técnica respecto a otras técnicas ICQ como ABC o LSAB [32].

El revelado se realizó con glucosa oxidasa*. Esta enzima oxida la glucosa presente en el tejido y libera H_2O_2 , que, al reaccionar con diaminobencidina (DAB), genera a su vez un producto que es procesado por la peroxidasa de rábano (HRP), formando así el precipitado negro visible a microscopio óptico.

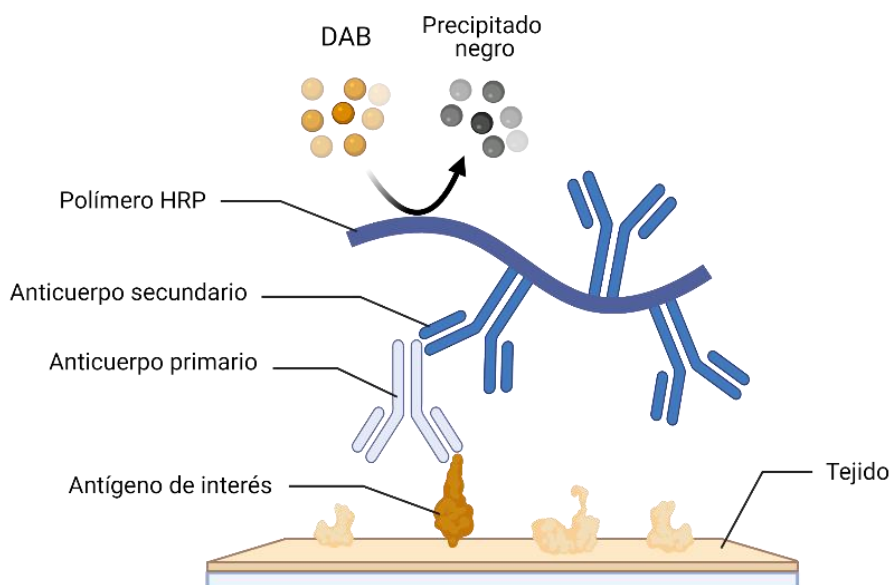


Figura 7. Representación gráfica de la técnica inmunocitoquímica indirecta mediante el método polimérico EnVision™ y el revelado con glucosa oxidasa.

* Los reactivos y protocolo de la ICQ se encuentran en el apartado 9. Anexos.

3.2.2 Expresión y recuento de células IR para PYY

El recuento de células IR para PYY en los sesenta cortes se llevó a cabo mediante la observación directa de las preparaciones en un microscopio pentacabezal, a un aumento de x40 (Figura 8). Se contaron aquellas células con el citoplasma marcado por el precipitado negro y con el núcleo sin teñir.

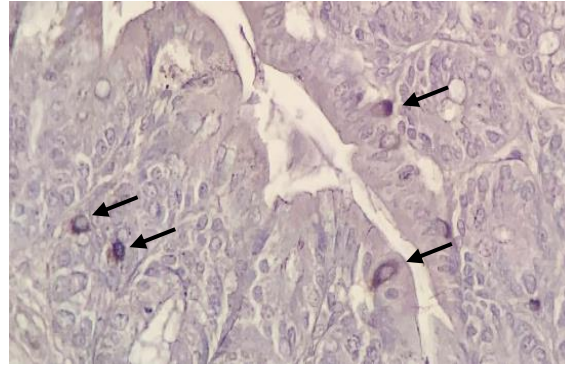


Figura 8. Sección de colon de ratón a un aumento de x40. Las células L IR para PYY, señaladas por las flechas, presentan un precipitado negro en el citoplasma tras el revelado con glucosa oxidasa, mientras que el núcleo permanece sin teñir.

3.2.3 Análisis de imagen

Para calcular la densidad de células IR para PYY por mm² de tejido, fue necesario medir el área epitelial de la túnica mucosa del colon de los animales. Para ello, se escanearon los cortes histológicos usando el escáner Leica Aperio C S2 del CIMA. Las imágenes se digitalizaron automáticamente mediante el programa Aperio ImageScope.

Posteriormente, se utilizó el sistema de análisis de imagen QuPath-0.2.2 para seleccionar manualmente la superficie de interés con la herramienta *Wand Tool* (Figura 9), y así obtener el área referente al epitelio de la túnica mucosa del corte n° 11 de todos los animales.

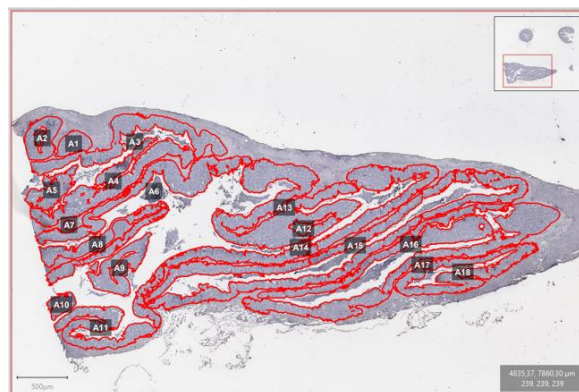


Figura 9. Selección del área del epitelio de la túnica mucosa del colon de los ratones con QuPath.

3.2.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa de Rstudio, así como la mayor parte de las representaciones gráficas, para las cuales también se empleó GraphPad. En este estudio, se compararon las medias de los siguientes grupos:

- Densidad de células IR para PYY entre ratones NOD y NOD/Scid macho de 32 semanas.
- Densidad de células IR para PYY entre ratones NOD macho de 20 y 32 semanas.*
- Densidad de células para PYY entre ratones NOD macho normoglucémicos e hiperglucémicos de 32 semanas.**
- Densidad de células IR para PYY y GLP-1 entre ratones NOD macho de 32 semanas.**

* Los datos de las células IR para PYY en colon de ratones NOD macho de 20 semanas se obtuvieron del TFG de Javier Rosendo Matachana (2015).

** Los datos de las glucemias y de células IR para GLP-1 se obtuvieron de la Tesis Doctoral de la Dra. Alcaraz Ortega (2012).

Densidad de células IR para PYY en colon de ratones NOD y NOD/Scid macho de 32 semanas

Se compararon los datos de células IR para PYY entre los grupos de ratones NOD y NOD/Scid de 32 semanas. Para ello fue necesario efectuar un test de normalidad Shapiro-Wilk y un análisis de similitud de las varianzas (F test) antes de efectuar el T de Student para dos muestras independientes.

Densidad de células IR para PYY en colon de ratones NOD macho de 20 y 32 semanas

Se comparó el número de células IR para PYY entre los dos grupos de ratones (20 y 32 semanas de edad) mediante un t-test para dos muestras independientes. Además, se realizó el test de normalidad Shapiro-Wilk y un F test para el análisis de similitud de las varianzas.

Densidad de células IR para PYY en colon de ratones NOD macho normoglucémicos e hiperglucémicos de 32 semanas

Se separaron en dos grupos los ratones tipo NOD (R-70, 72, 74, 77, 78, 80, 81, 82, 168 y 169) en función de sus niveles medios de glucemia (Figura 10): hiperglucémicos (R-70, 77, 80, 168 y 169) y normoglucémicos (R-72, 74, 78, 81). Se excluyó al ratón R-82 de este estudio ya que era el único ratón diabético de 32 semanas de edad y no sería estadísticamente posible comparar sus datos con los otros grupos.

Se realizó un test de normalidad Shapiro-Wilk, un F test (similitud de varianzas) y una T de Student para dos muestras independientes.

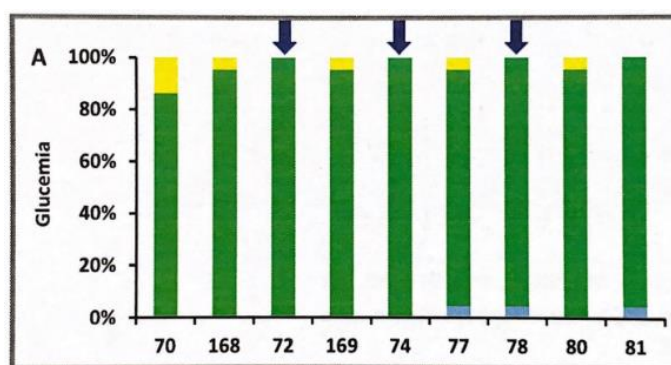


Figura 10. Frecuencias relativas de glucemia de los ratones NOD machos de 32 semanas de edad. Gráfico perteneciente a la Tesis Doctoral de la Dra. Alcaraz (Figura 86 A, página 141). La subdivisión del grupo de ratones NOD entre normoglucémicos e hiperglucémicos se realizó en base a este gráfico.

Densidad de células IR para PYY y GLP-1 en colon de ratones NOD macho de 32 semanas

Al igual que en el primer caso, se comparó el número de células IR para ambas moléculas en ambos grupos de ratones mediante un t-test para dos muestras independientes. También se realizó el test de normalidad Shapiro-Wilk y un F test para el análisis de similitud de las varianzas.

4. Resultados

4.1 Expresión de PYY en colon de ratones NOD y NOD/Scid de 32 semanas

Se observó expresión de PYY tanto en los plexos nerviosos como en células epiteliales localizadas en las criptas de Lieberkühn (Figura 11A). Se pudo apreciar expresión de PYY tanto en el plexos submucoso (Figura 11B y Figura 11C) como en el mientérico (Figura 11D), aunque en este último la inmunorreactividad fue algo más leve.

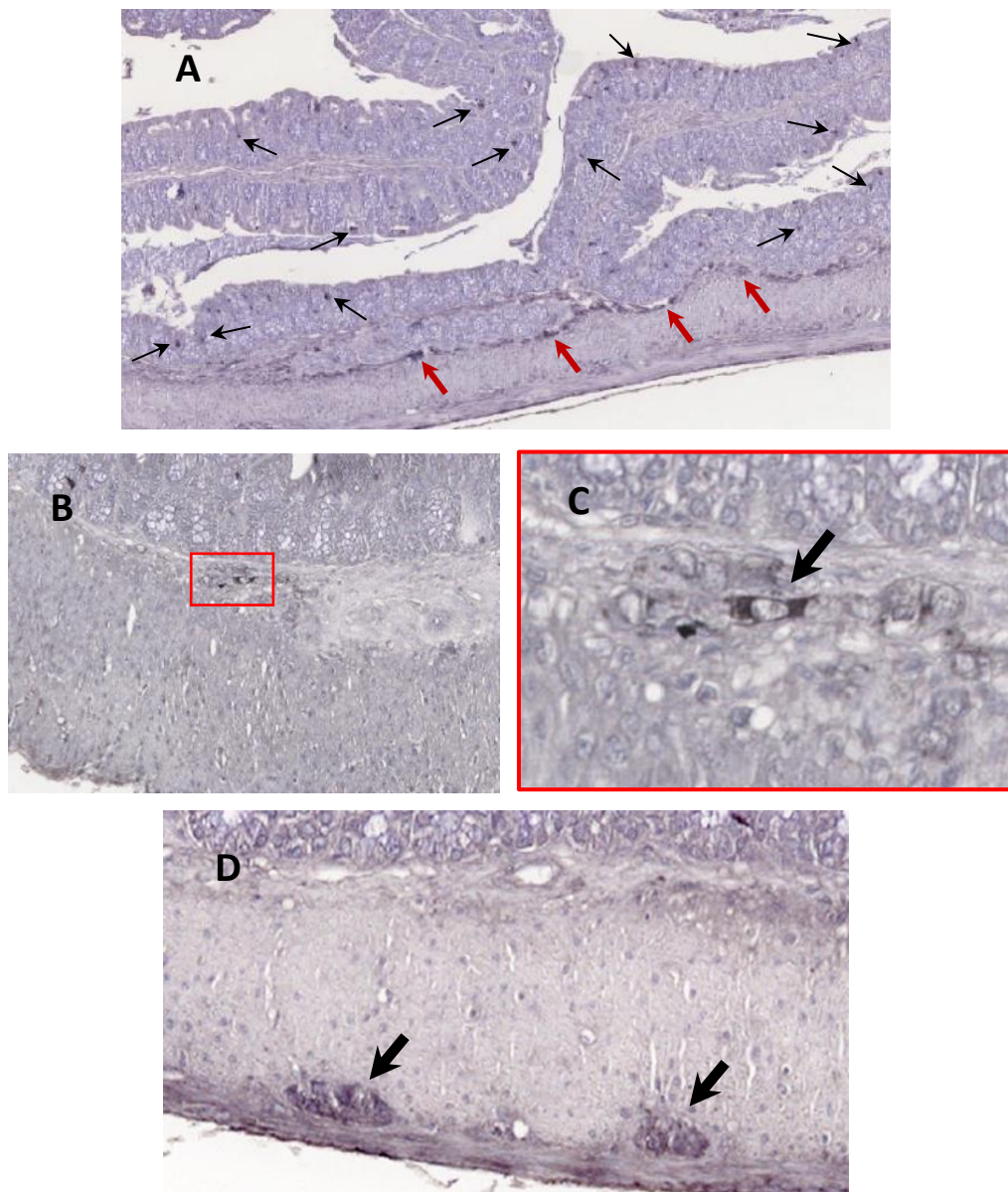


Figura 11. (A) Panorámica de una sección de colon a x20, las flechas negras señalan las células L IR para PYY, mientras que las flechas rojas señalan los plexos nerviosos positivos para PYY. (B) Sección de colon a un aumento de x40, el recuadro rojo señala el plexo submucoso, que presenta positividad para PYY. (C) Ampliación de la imagen B. (D) Sección de colon x40 con flechas que señalan el plexo mientérico IR para PYY, aunque la positividad es algo más leve.

Como se ha mencionado anteriormente, en el apartado 3.2.2 *Recuento de células IR para PYY*, solo aquellas células con el citoplasma negro y el núcleo sin teñir fueron consideradas como IR y, por lo tanto, incluidas en el conteo. En la Figura 12A y Figura 12B podemos ver células L que cumplen estas características a un aumento de x100, situadas en el epitelio de la túnica mucosa del colon.

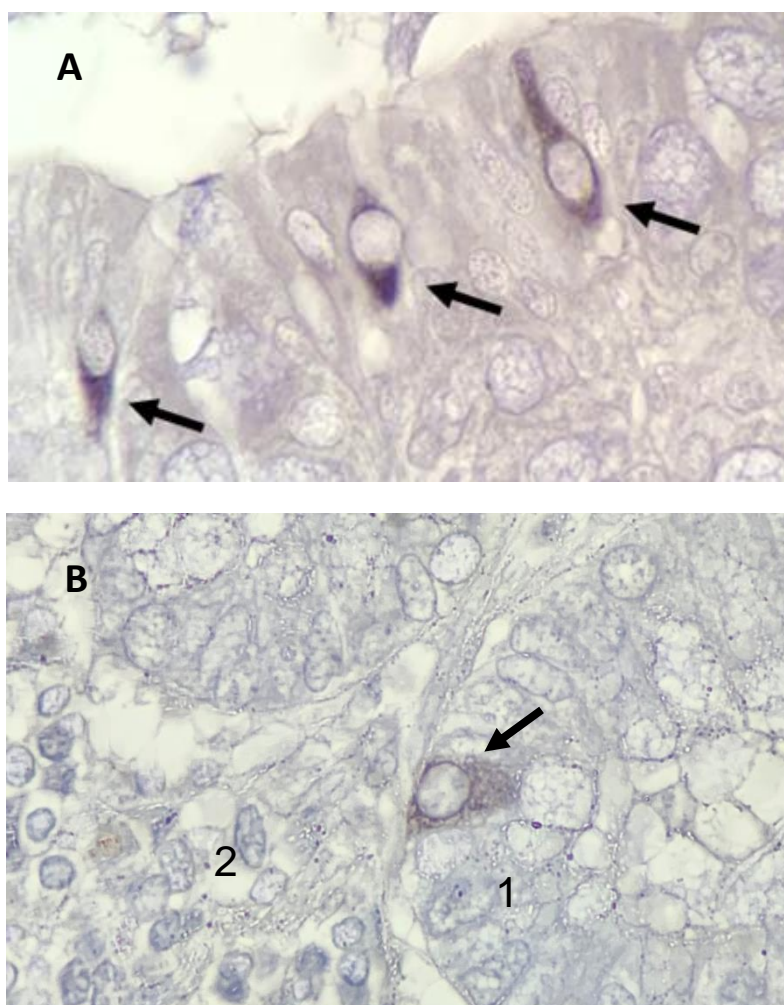


Figura 12. Secciones de colon de ratón a un aumento de x100. Las células L IR para PYY, señaladas por las flechas tanto en (A) como en (B), presentan un precipitado negro en el citoplasma tras el revelado con glucosa oxidasa. A este aumento también se puede apreciar tanto el epitelio de la túnica mucosa (B1) como la lámina propia (B2).

Posteriormente, se halló la media de células IR para PYY mediante el cálculo promedio del total de células que sumaban los tres cortes de colon de cada ratón (“Promedio células IR” Tabla 2 y Tabla 3). La densidad celular se calculó a partir de la división del promedio de células IR dividido entre los mm² de tejido epitelial del corte central del colon de cada ratón (corte n°11).

<i>NOD</i>			
Ratón	Promedio células IR	Área (mm ²) del epitelio	Densidad celular (promedio células IR /mm ² epitelio)
R-70	271	9,4	28,8
R-72	388	5,6	69,3
R-74	94,3	4,9	19,2
R-77	406	5,3	76,6
R-78	373,7	4,6	81,2
R-80	286,7	4	71,7
R-81	319,7	5	63,9
R-82	142,7	4,6	31
R-168	125,7	7,6	16,5
R-169	349	8,5	41,1
Medias	275,7	5,9	46,7

Tabla 2. Datos correspondientes a los ratones NOD: promedio de células IR por ratón, área del epitelio de la túnica mucosa del colon y la densidad celular (relación de células IR por mm² de tejido).

<i>NOD/Scid</i>			
Ratón	Promedio células IR	Área (mm ²) del epitelio	Densidad celular (promedio células IR /mm ² epitelio)
R-83	149	3,9	38,2
R-85	273,7	6,3	43,4
R-86	198,3	4,3	46,1
R-87	386	7,4	52,2
R-88	435	6,5	66,9
R-89	315,7	5,9	53,5
R-91	292,3	5,2	56,2
R-92	254,3	11,4	22,3
R-93	249,3	7,1	35,1
R-94	192,7	8,9	21,7
Medias	274,6	6,7	41

Tabla 3. Datos correspondientes a los ratones NOD/Scid: promedio de células IR por ratón, área del epitelio de la túnica mucosa del colon y la densidad celular (relación de células IR por mm² de tejido).

4.2 Comparación entre ratones NOD y NOD/Scid de 32 semanas

Al estudiar los datos obtenidos de la densidad de células IR para PYY en colon de ratones macho NOD y NOD/Scid de 32 semanas, el test de normalidad Shapiro-Wilk resultó no significativo, con un p-valor de 0,4295 ($P > 0,05$), por lo que se asumió la normalidad de los datos. Por otra parte, el F test para comparar las varianzas también resultó no significativo con un p-valor de 0,1191 ($P > 0,05$), por lo que no se rechazó la hipótesis nula y se consideraron iguales las varianzas de ambos grupos.

El T test para dos muestras independientes con un IC del 95% mostró un p-valor de 0,5026 (Tabla 4), por lo que no se rechazó la hipótesis nula ($P > 0,05$). Es decir, no se apreciaron diferencias significativas entre la densidad de células IR para PYY en colon de ratones NOD y NOD/Scid.

Al representar gráficamente los resultados (Figura 13), se observa que el rango de valores obtenidos en el grupo de ratones NOD es más disperso que el de los ratones NOD/Scid. Existen valores atípicos en ambos grupos, fuera del intervalo, por lo que se puede afirmar que se trata de dos grupos bastante heterogéneos.

♂ NOD - NOD/Scid					IC 95%	
PYY	\bar{X}_{NOD}	$\bar{X}_{\text{NOD/Scid}}$	T(df)	p-value	Lower	Upper
	50,0039	43,6827	0,6842 (18)	0,5026	-13,0887	25,7311

Tabla 4. Resultados obtenidos en el T test para dos muestras independientes al comparar las células IR para PYY en ratones macho NOD y NOD/Scid de 32 semanas.

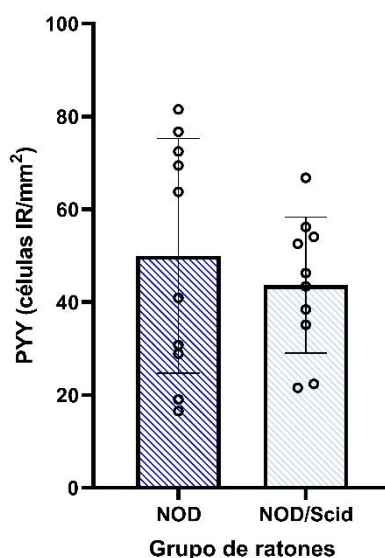


Figura 13. Representación gráfica de los resultados obtenidos en el T test para dos muestras independientes al comparar las células IR para PYY en ratones macho NOD y NOD/Scid de 32 semanas.

4.3 Comparación entre ratones NOD de 20 y 32 semanas

Se comparó la densidad de células IR para PYY entre los grupos de ratones NOD macho de 20 y 32 semanas de edad. El test de normalidad Shapiro-Wilk mostró un p-valor de 0,4201 ($P > 0,05$), por lo que se asumió la normalidad de los datos. Por otra parte, el F test para el análisis de las varianzas reveló un p-valor de 0,9853, considerando así las varianzas de ambos grupos iguales.

El t-test para dos muestras independientes con un IC del 95%, reveló un p-valor de 0,2539 ($P > 0,05$), por lo que no se apreciaron diferencias significativas entre el grupo de 20 semanas y el de 32 en cuanto a la expresión del PYY (Tabla 5).

En la representación gráfica de los datos (Figura 14), a pesar de que las diferencias no sean significativas estadísticamente, se observa un ligero descenso en cuanto a la densidad de células IR para PYY en ratones de 32 semanas con respecto a los de 20, lo cual concuerda con el estudio de la Dra. Alcaraz, donde se vio una mayor expresión de GLP-1 en ratones de 20 semanas con respecto a los de 32.

20 semanas - 32 semanas					IC 95%	
PYY	$\bar{X}_{20\text{sem}}$	$\bar{X}_{32\text{sem}}$	T(df)	p-value	Lower	Upper
	63,289	50,004	-1,1786 (18)	0,2539	-36,96609	10,39649

Tabla 5. Resultados obtenidos en el T test para dos muestras independientes al comparar las células IR para PYY en ratones NOD macho de 20 y 32 semanas.

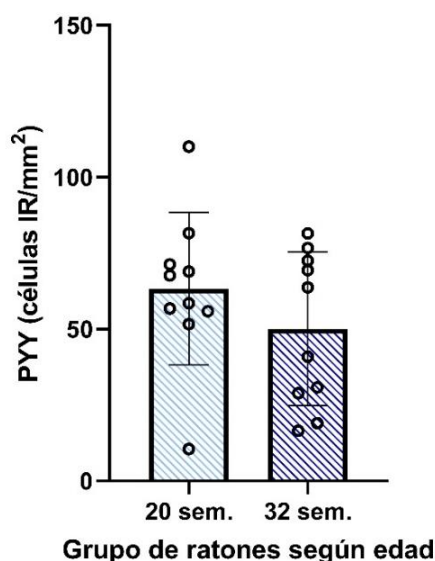


Figura 14. Representación gráfica de los resultados obtenidos en el T test para dos muestras independientes al comparar las células IR para PYY en ratones macho NOD de 20 y 32 semanas.

4.4 Comparación entre ratones NOD normoglucémicos e hiperglucémicos de 32 semanas

Al comparar la densidad de células IR para PYY entre los grupos de ratones NOD normoglucémicos e hipoglucémicos de 32 semanas, se consideraron varianzas iguales, ya que el F test reveló un p-valor de 0,9059 ($P>0,05$).

Por otra parte, al representar gráficamente el T test para dos muestras independientes con un IC del 95%, se observó que la media de expresión de células IR para PYY era claramente superior en el grupo de ratones normoglucémicos (Tabla 6). Sin embargo, el p-valor obtenido fue de 0,55, por lo que no se consideró una diferencia significativa ($P>0,05$).

En la representación gráfica de los datos se puede observar claramente que la mediana del grupo de ratones normoglucémicos es superior al de ratones hiperglucémicos (Figura 15), al igual que la media de células IR de cada grupo ($58,5>47,2$ células IR para PYY/mm²). A pesar de que no se considere estadísticamente significativo y de que el tamaño muestral sea muy reducido, se puede apreciar cierto descenso en la densidad de células IR para PYY en los ratones NOD hiperglucémicos respecto a los normoglucémicos.

Normoglucémicos - Hiperglucémicos					IC 95%	
PYY	\bar{X}_{normo}	\bar{X}_{hiper}	T(df)	p-value	Lower	Upper
	58,5	47,2	-0,62791 (7)	0,55	-53,85395	31,25395

Tabla 6. Resultados obtenidos en el T test para dos muestras independientes al comparar las células IR para PYY en ratones NOD macho normoglucémicos e hiperglucémicos de 32 semanas.

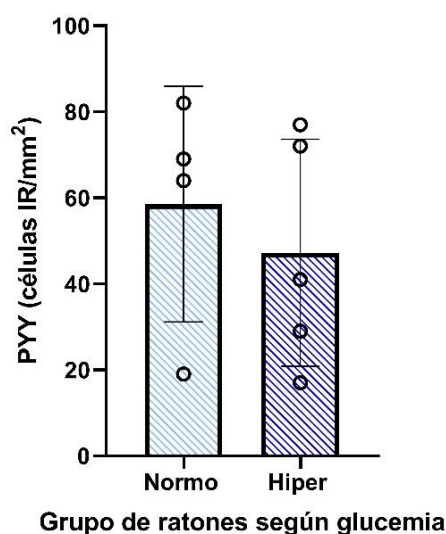


Figura 15. Representación gráfica de los resultados del T test para dos muestras independientes al comparar las células IR para PYY en ratones NOD macho normoglucémicos e hiperglucémicos de 32 semanas.

4.5 Comparación entre la densidad de células IR para PYY y GLP-1 en ratones NOD de 32 semanas

Se comparó la densidad de células IR para PYY y GLP-1 en el grupo de ratones NOD macho de 32 semanas. El test de normalidad Shapiro-Wilk mostró un p-valor de 0,3918 ($P > 0,05$), por lo que se asumió la normalidad de los datos. Por otra parte, el F test para el análisis de las varianzas reveló un p-valor de 0,06004, un dato cercano al 0,05 necesario para considerar las varianzas de ambos grupos significativamente distintas, pero al ser $P > 0,05$ se tuvieron que considerar iguales.

El t-test para dos muestras independientes con un IC del 95%, mostró un p-valor de 0,6602 ($P > 0,05$), por lo que no se apreciaron diferencias significativas entre el grupo NOD_{PYY} y NOD_{GLP-1} (Tabla 7).

En la representación gráfica de los datos (Figura 16), no existen a penas diferencias en cuanto a expresión de GLP-1 frente a la de PYY en los ratones NOD. Además, el rango de valores para células IR para GLP-1/mm² está incluido en el de células IR para PYY.

PYY - GLP-1				IC 95%		
32 sem.	\bar{X}_{PYY}	\bar{X}_{GLP-1}	T(df)	p-value	Lower	Upper
	50,0039	45,9857	-0,44704 (18)	0,6602	-22,90231	14,86591

Tabla 7. Resultados obtenidos en el T test para dos muestras independientes al comparar las células IR para PYY y GLP-1 en ratones NOD macho de 32 semanas.

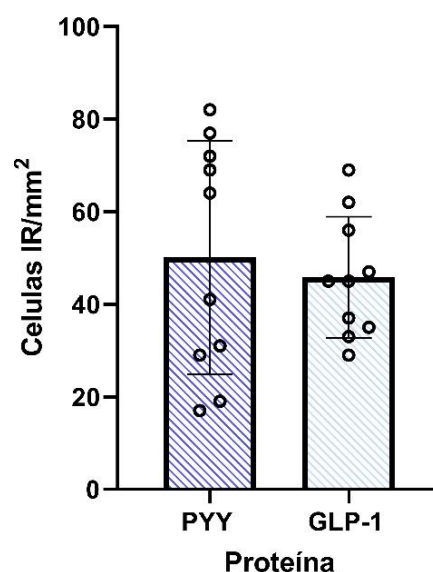


Figura 16. Representación gráfica de los resultados obtenidos en el T test para dos muestras independientes al comparar las células IR para PYY y GLP-1 en ratones macho NOD de 32 semanas.

5. Discusión

El estudio de las células endocrinas del sistema digestivo relacionadas con la motilidad gastrointestinal en diabetes se ha centrado tanto en pacientes como modelos animales. Esto se debe a la similitud que guardan los síntomas gastrointestinales de estos animales con los de los pacientes diabéticos [29]. Las variaciones en la densidad de estas células pueden empezar antes del inicio de la diabetes o como consecuencia del desarrollo de la enfermedad [33].

Las hormonas sintetizadas por el colon que participan en la inhibición del vaciamiento gástrico, estimulación del efecto saciante, enlentecimiento de la motilidad intestinal y modulación del freno ileal son el GLP-1 y el PYY. Además, se sabe que ambas moléculas co-localizan en células L del colon y que existe cierto equilibrio entre las diferentes poblaciones de estas células (coexpresoras y monoexpresoras) [29].

En este trabajo se ha observado una disminución no significativa de la densidad de células IR frente a PYY en ratones NOD macho de 32 semanas con respecto al grupo control (NOD/Scid). Este resultado concuerda con el obtenido por Lugari y colaboradores para la expresión de GLP-1 en pacientes diabéticos [24].

Los resultados obtenidos en este TFG también concuerdan con los resultados obtenidos en el estudio de células IR para GLP-1 de la Dra. Alcaraz [27], ya que no se han encontrado diferencias significativas en el número de células IR para PYY en los modelos predispuestos a desarrollar la enfermedad (ratones NOD) con respecto al grupo control (NOD/Scid).

En el presente trabajo, se ha observado una disminución no significativa de la densidad de células IR para PYY en ratones NOD de 32 semanas al compararla con los ratones de 20 semanas (datos obtenidos del TFG de Don Javier Rosendo) [30]. Los resultados obtenidos coinciden con lo observado en el trabajo de la Dra. Alcaraz, en el cual el descenso sí fue estadísticamente significativo [27]. Esto podría indicar que la población de células L coexpresoras decae con la edad del animal, ya que también avanza el estadio de prediabetes.

Por último, se ha observado una disminución no significativa en la densidad de células IR para PYY en ratones NOD de 32 semanas hiperglucémicos con respecto a los normoglucémicos. Esto concuerda con Spångéus y colaboradores, que observaron un descenso significativo en el número de células IR para PYY en el colon de ratones NOD diabéticos con respecto a los prediabéticos [33].

Valverde y colaboradores, que estudiaron la variación de los niveles plasmáticos de GLP-1 mediante RIA, observaron un descenso en la concentración de esta molécula en las ratas BB-diabetes prone con respecto al grupo control (ratas BBc) [25]. Por su parte, la Dra. Alcaraz observó lo contrario, un aumento significativo de células IR para GLP-1 en colon de ratones prediabéticos (NOD) [27]. Esto podría deberse a que durante la diabetes las células endocrinas productoras de GLP-1 no liberen su contenido y estén “llenas”, pudiendo ser visualizadas mediante técnicas ICQ, como hizo la Dra. Alcaraz. Consecuentemente, los niveles plasmáticos de la molécula serían bajos y esto explicaría el descenso de GLP-1 observado por Valverde mediante RIA. Por otra parte, también podría ser posible que la población de células L monoexpresora de GLP-1 aumentara en el estadio de diabetes y se rompiera el equilibrio entre las diferentes poblaciones celulares y sus respectivas secreciones de GLP-1 y PYY, descrito por El-Salhy [29].

Sin embargo, Berghöfer y colaboradores demostraron por RIA que la expresión de GLP-1 en el intestino estaba inalterada de ratas BB [26], dato opuesto a lo observado por Valverde y Alcaraz. Esto, sumado a los resultados estadísticamente no significativos del presente TFG en ratones NOD normoglucémicos e hiperglucémicos, podría sugerir que efectivamente las poblaciones de células L coexpresoras (GLP-1/PYY) y monoexpresoras se mantienen estables en ratones prediabéticos y las secreciones de estas moléculas permanecen en equilibrio.

Sin embargo, el tamaño muestral de los grupos de ratones NOD macho normoglucémicos e hiperglucémicos del presente Trabajo Fin de Grado es reducido y se deberían realizar más estudios con más animales para poder obtener resultados concluyentes.

6. Conclusiones

- 1) No existen diferencias significativas en la densidad de células IR para PYY en el colon de ratones macho NOD y NOD/Scid de 32 semanas.
- 2) Existe una disminución no significativa de células IR para PYY en el colon de ratones NOD macho de 32 semanas con respecto a los de 20 semanas
- 3) Existe un aumento no significativo en la densidad de células IR para PYY en el colon de ratones NOD macho normoglucémicos de 32 semanas respecto a los hiperglucémicos de la misma edad.
- 4) No existen diferencias significativas en la densidad de células IR para PYY en colon de ratones NOD macho de 32 semanas con respecto a las células IR para GLP-1.

7. Agradecimientos

Para realizar este Trabajo Fin de Grado ha sido necesaria la ayuda de varios profesionales. En primer lugar, al técnico de laboratorio Javier García, que me ha enseñado a desenvolverme dentro del laboratorio y a realizar la técnica inmunocitoquímica de manera adecuada, superando los imprevistos y dificultades que surgieron. En segundo lugar, a la técnico de investigación del CIMA Ainhoa Urbiola, por ayudarme a escanear las preparaciones histológicas con paciencia. Y, por último, a la tutora de este trabajo M^a Elena Bodegas Frías, además de por sus consejos y supervisión, le agradezco especialmente el cariño y la pasión que pone a su trabajo y que transmite a través de sus enseñanzas.

8. Bibliografía

- [1] <https://www.who.int/diabetes/infographic/es/#:~:text=El%20n%C3%BAmero%20de%20casos%20de,el%20riesgo%20de%20muerte%20prematura>
- [2] **Rubio Cabezas O, Argente J.** “Diabetes mellitus: formas de presentación clínica y diagnóstico diferencial de la hiperglucemia en la infancia y adolescencia”. *An Pediatr (Barc)*. 2012;77(5):344.e1-344.e16.
- [3] **Kristinsson JK. Diabetic retinopathy.** “Screening and prevention of blindness. A doctoral thesis”. *Acta Ophthalmol Scand Suppl*. 1997;(223):1-76. PMID: 9559048.
- [4] **Avalos SF, Matute SS, del Barrio SM, Rodríguez JO, García IJ, Rico AP.** “Síndrome de hiperglucemia hiperosmolar no cetósica: un raro debut diabético en la infancia”. *An Pediatr (Barc)*. 2010;72(2):146–7.
- [5] **American Diabetes Association.** “(2) Classification and diagnosis of diabetes”. *Diabetes Care*. 2015;38 Suppl:S8–16.
- [6] **Landin-Olsson M.** “Latent autoimmune diabetes in adults”. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;958(1):112–6.
- [7] **Pearson JA, Wong FS, Wen L.** “The importance of the Non Obese Diabetic (NOD) mouse model in autoimmune diabetes”. *J Autoimmun*. 2016;66:76–88.
- [8] **Mullen Y.** “Development of the nonobese diabetic mouse and contribution of animal models for understanding type 1 diabetes”. *Pancreas*. 2017;46(4):455–66.
- [9] **Marathe CS, Rayner CK, Wu T, et al.** “Gastrointestinal Disorders in Diabetes”. [Updated 2020 Jan 11]. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al., editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553219/>
- [10] **Furness JB.** “The enteric nervous system and neurogastroenterology”. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012;9(5):286–94.
- [11] **Fukui H, Xu X, Miwa H.** “Role of gut Microbiota-gut hormone axis in the pathophysiology of functional gastrointestinal disorders”. *J Neurogastroenterol Motil*. 2018;24(3):367–86.
- [12] **Spångéus A, Forsgren S, el-Salhy M.** “Does diabetic state affect co-localization of peptide YY and enteroglucagon in colonic endocrine cells?” *Histol Histopathol*. 2000;15(1):37–41.
- [13] **Escalada FJ.** “Fisiología del GLP-1 y su papel en la fisiopatología de la diabetes mellitus tipo 2”. *Med Clin (Barc)*. 2014;143:2–7.

- [14] **Michos ED, Tuttle KR.** “GLP-1 receptor agonists in diabetic kidney disease”. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2021;CJN.18771220.
- [15] **Giménez Palop O, Caixàs A.** “Péptido YY: una nueva estrategia para el tratamiento de la obesidad”. *Endocrinol Nutr.* 2009;56(1):1–3.
- [16] **Steinert RE, Feinle-Bisset C, Asarian L, Horowitz M, Beglinger C, Geary N.** “Ghrelin, CCK, GLP-1, and PYY(3–36): Secretory controls and physiological roles in eating and glycemia in health, obesity, and after RYGB”. *Physiol Rev.* 2017;97(1):411–63.
- [17] <https://www.laparoscopic.md/es/glosario/freno-ileal#:~:text=El%20freno%20ileal%20es%20un,de%20retroalimentaci%C3%B3n%20del%20%C3%ADleo%20distal>.
- [18] **Vidal J.** “Modulación del efecto incretina en el tratamiento de la diabetes”. *Med Clin (Barc).* 2014;143:8–11.
- [19] **Baggio LL, Drucker DJ.** “Biology of incretins: GLP-1 and GIP”. *Gastroenterology.* 2007;132(6):2131–57.
- [20] **Vilsbøll T, Krarup T, Deacon CF, Madsbad S, Holst JJ.** “Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients”. *Diabetes.* 2001;50(3):609–13.
- [21] **Knop FK, Vilsbøll T, Højberg PV, Larsen S, Madsbad S, Vølund A, et al.** “Reduced incretin effect in type 2 diabetes: cause or consequence of the diabetic state?: Cause or consequence of the diabetic state?” *Diabetes.* 2007;56(8):1951–9.
- [22] **Boey D, Heilbronn L, Sainsbury A, Laybutt R, Kriketos A, Herzog H, et al.** “Low serum PYY is linked to insulin resistance in first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes”. *Neuropeptides.* 2006;40(5):317–24.
- [23] **Vilsbøll T, Krarup T, Sonne J, Madsbad S, Vølund A, Juul AG, et al.** “Incretin secretion in relation to meal size and body weight in healthy subjects and people with type 1 and type 2 diabetes mellitus”. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(6):2706–13.
- [24] **Lugari R, Dell’Anna C, Ugolotti D, Dei Cas A, Barilli AL, Zandomeneghi R, et al.** Effect of nutrient ingestion on glucagon-like peptide 1 (7-36 amide) secretion in human type 1 and type 2 diabetes. *Horm Metab Res.* 2000;32(10):424–8.
- [25] **Valverde I, Wang G-S, Burghardt K, Kauri LM, Redondo A, Acitores A, et al.** “Bioactive GLP-1 in gut, receptor expression in pancreas, and insulin response to GLP-1 in diabetes-prone rats”. *Endocrine.* 2004;23(1):77–84.

- [26] **Berghöfer P, Peterson RG, Schneider K, Fehmann HC, Göke B.** “Incretin hormone expression in the gut of diabetic mice and rats”. *Metabolism*. 1997;46(3):261–7.
- [27] **Alcaraz Ortega, R.** “Estudio de la expresión de la hormona incretínica GLP-1 en dos modelos animales de diabetes mellitus tipo 1 (ratones NOD y ratones BALB/C tratados con estreptozotocina)” [Tesis Doctoral]. Facultad de Ciencias, Universidad de Navarra. 2012.
- [28] **El-Salhy M, Mazzawi T, Gundersen D, Hatlebakk JG, Hausken T.** “The role of peptide YY in gastrointestinal diseases and disorders (review)”. *Int J Mol Med*. 2013;31(2):275–82.
- [29] **El-Salhy M, Suhr O, Danielsson A.** “Peptide YY in gastrointestinal disorders”. *Peptides*. 2002;23(2):397–402.
- [30] **Rosendo Matachana, J.** “Estudio de la expresión de PYY en el colon de ratones NOD machos y hembras de 20 semanas” [Trabajo Fin de Grado]. Facultad de Ciencias, Universidad de Navarra. 2015.
- [31] <https://www.enzolifesciences.com/BML-PA1254/peptide-tyrosine-tyrosine-polyclonalantibody/>
- [32] **Echarri Guembe L.** “Capítulo 6: Técnicas inmunohistoquímicas”. Montuenga L., Esteban F, Calvo A. “Técnicas en histología y biología celular”. *la Ciudad Condal, España: Elsevier Masson*; 2014. p. 103–25.
- [33] **Spångéus A, El-Salhy M.** “Large intestinal endocrine cells in non-obese diabetic mice”. *J Diabetes Complications*. 1998;12(6):321–7.

9. Anexos

9.1 Reactivos de la inmunocitoquímica

- ✓ H₂O₂ (peróxido de hidrógeno, Panreac/141077)
- ✓ TBS (Tris Buffer Salino) pH 7,36 1x
- ✓ Suero normal de cabra dilución 1:20 (Dako/X0907)
- ✓ Antisuero primario de conejo, dilución 1:500 (Enzo life Sciences/PA1254)
- ✓ Sistema de amplificación EnVision™ + glucosa-oxidasa
 - Polímero HRP a la concentración original
 - Solución de revelado (1 mL): Glucosa oxidasa (0,5 mL) + DAB (0,5 mL)
- ✓ Tinción de contraste: Hematoxilina de Harris (Hematoxin-Monohydrate, Merk/1159380025)
- ✓ Pegamento DPX (BDH Prolabo/360294H)

9.2 Protocolo de la técnica inmunocitoquímica

- 1) Poner los cortes en la estufa a 60°C durante 30 min.
- 2) Poner los cortes en xilol durante 20-30 min.
- 3) Pasar los cortes por la columna de hidratación hasta agua del grifo, 2 min/líquido).
- 4) Cortes en la solución de bloqueo de la peroxidasa (coplin con 5 mL H₂O₂ + 45 mL de H₂O desionizada) en oscuridad durante 10 min.
- 5) Lavado en agua corriente durante 5 min.
- 6) Lavado de 5min. en TBS 1x.
- 7) Secar los portas y les poner 1 gota de suero normal (SN) de cabra 1:20 (50 µL por cada preparación aprox.) durante 30 min. en la cámara húmeda.
- 8) Decantar el SN de cabra y poner el ac primario a dilución 1:500 (50 µL por cada preparación). Dejar incubar toda la noche en cámara húmeda a 4°C.
- 9) Atemperar las muestras y el HRP (anti Rabbit) durante 15 min.
- 10) Lavar dos veces en TBS 1x durante 5 min. cada vez.
- 11) Incubar con el HRP anti-Rabbit (1 gota por preparación) durante 30 min. en la cámara húmeda.
- 12) Dos lavados en TBS 1x de 5 min. cada uno.
- 13) Lavar en acético acetato 1x (pH 5,6) bajo la campana de revelado durante 5 min.
- 14) Aplicar 50 µL de solución de revelado* por preparación y la dejar actuar 2 min aproximadamente (visualizar la reacción por el microscopio).
- 15) Parar la reacción sumergiendo los portas en un coplin con agua del grifo.
- 16) Lavar las preparaciones con agua corriente durante 5 min.
- 17) Contrastar con hematoxilina de Harris durante 5-7 segundos.
- 18) Eliminar el exceso de hematoxilina con agua corriente (con cuidado).
- 19) Pasar los portas por la columna de deshidratación hasta xilol (1 min/alcohol y 4 min. en xilol).
- 20) Montar el cubre con pegamento DPX y lo dejar secar al aire.

* La solución de revelado debe prepararse justo antes de revelar y siempre bajo la campana de revelado. Se mezclan cantidades iguales de glucosa oxidasa y DAB y se agita el tubo eppendorf con el vórtex.